Cyclophosphamide와 고용량 Methylprednisolone 병용요법이 흰쥐의 급성 파라쿼트 중독에 미치는 효과

연세대학교 의과대학 응급의학과

김욱진 · 정성필 · 박유석 · 이민구* · 김승호 · 이한식

= Abstract =

Effect of Cyclophosphamide and High Dose Methylprednisolone on Paraquat Poisoned Rats

Uk Jin Kim, M.D., Sung Pil Chung, M.D., Yoo Shuk Park, M.D.,
Min Goo Lee, M.D.*, Seung Ho Kim, M.D., Hahn Shick Lee, M.D.

Department of Emergency Medicine, and Pharmacology*
Yonsei University College of Medicine

Background: Paraquat(PQ) is used widely all over the world for its excellent effect as a herbicide. But its mortality rate is known to be very high, because there is no effective therapeutic modality. Recently, surprising improvement in survival rate was reported using the cyclophosphamide & methylprednisolone pulse therapy in paraquat poisoning. However, this report was not based upon animal study, we designed this experiment to confirm the therapeutic effect.

Methods: Under the halothane anesthesia, paraquat dichloride 40 mg/kg was injected intraperitoneally to 18 Sprague-Dawley rats. Two hours later, cyclophsphamide 40 mg/kg IP and methylprednisolone 62.5 mg/kg IM were injected in the treatment group(n=9). After 24 hours, we examined serum creatinine levels and pathologic findings of lung stained with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome. And 72 hour mortality was compared between 2 groups(5 rats respectively).

Results: There were no statistical differences between the treatment group and control group in serum creatinine level, degree of lung injury, and survival rates.

Conclusion: Cyclophosphamide and high dose methylprednisolone combination therapy did not decrease pulmonary toxicity and mortality of paraquat poisoned rats. Further animal studies using various doses and administrative methods of above medications are necessary to demonstrate their effects.

Key Words: Paraquat poisoning, Cyclophosphamide, Methylprednisolone

저자 연락처: 이 한 식 서울시 서대문구 신촌동 134번지 연세의대 응급의학과
Tel: 02) 361-5790, Fax: 02) 392-3715, E-mail: emer@yumc.yonsei.ac.kr

I. 서 론

파라쿼트(1,1'-dimethyl-4,4' dipyridylium)는 19세기에 산화 환원 지시제로 합성되었으며, 1955년 제초제로서의 우수한 효과가 알려지면서 전세계적으로 사용되고 있다. 하지만 사람에게 치명적인 독작용을 일으켜 일본의 경우 연간 1300명이 사망하는 것으로 보고되었으며[1,2] 국내의 경우에도 1970년 제초제로 사용된 이후 연간 사망자수가 1000여명에 이르는 것으로 조사되었다[3].

파라쿼트가 독성을 일으키는 기전은 확립되지는 않았으나 체내에 흡수된 파라쿼트가 NADPH로부터 전자를 받아 환원형 파라쿼트로 전환되며, 산소분자를 superoxide기(O_2), hydroperoxy기(HO_2) 및 과산화수소(H_2O_2)를 형성하여 이들이 세포막의 지방과 결합하여 지방유리기를 형성함으로써 조직손상을 일으키는 것으로 알려져 있다[4]. 하지만 뚜렷한 치료법이 없어 성인이 농도 20%인 파라쿼트 용액을 15 ml 이상 복용하게 되면 사망률이 100%로 알려지고 있다[5].

파라쿼트 중독시 여러 장기에 독성을 초래하게 되는데 폐장[6-10] 및 신장[11]에 주로 독성을 나타내며, 특히 산소가 풍부한 폐장의 독성이 가장 심각하여 사망의 주원인으로 알려져 있다[12]. 파라쿼트 중독에 대한 치료로는 체내로의 파라쿼트 흡수를 방지하기 위한 위세척 및 훌러스어스, Bentonite 등의 흡착제[7,13,14] 등이 사용되며, 이미 혈중에 용해된 파라쿼트를 제거하기 위해 강제 이뇨, 혈액투석 또는 혈액관류 등[13,15,16]이 시행되고 있으며 산소독성을 줄이기 위해 저산소요법[17] 및 superoxide dismutase 투여[18,19]가 시도되기도 하였다. 또한 prednisone 및 azathioprine 등의 면역억제제가 시도되기도 하였으나 효과가 없었다[20]. 고용량의 cyclophosphamide 와 dexamethasone을 사용하는 방법을 사용하여 75%라는 높은 생존율이 보고되었으나[21] 이후 이 치료법의 효과를 증명하지는 못하였다[22].

최근 Lin등은 파라쿼트 음독량이 너무 적거나 너무 많은, 경증 및 치명적인 환자를 제외한 중등도 및 중증의 환자를 대상으로 cyclophosphamide 와 methylprednisolone 병용요법을 시행, 염증반응을 억제함으로써 대조군에 비해 약 40%의 생존율의 증가를 보고하였다[23]. 하지만 이 연구는 적절한 동물실험 없이 폐의 염증반응이 동반되는 다른 질환군에서 이러한 약물들의 항염증 작용에 의해 치료효과가 있음에 착안한 것이었다. 따라서 저자들은 흰쥐의 파라쿼트 중독 모델에서 Lin 등이 제안한 고용량 cyclophosphamide와 methylprednisolone 병용요법의 효과를 검증하고자 하였다.

II. 대상과 방법

체중 470-540 g의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley) 18마리를 임의로 9마리씩 파라쿼트를 투여한 후 cyclophosphamide와 고용량의 methylprednisolone을 투여하는 치료군인 1군과 파라쿼트만 투여하는 대조군인 2군으로 나눈다. 할로탄 마취 및 주사용액이 쥐에게 미치는 효과를 비교하기 위해 추가로 2마리를 기본군으로 임의로 분류하여 흡입마취후 1군과 2군에 사용된 각 약물의 용매액을 동일량, 동일방법으로 투여하였다. 실험 기간 동안 모든 쥐는 같은 조건에서 사육, 보관되었다.

각각의 쥐는 동물용 마취기를 사용하여 5% 할로탄으로 흡입마취를 유도하고 체중을 측정하였다. 안면마스크를 이용하여 마취를 유지하면서 복부를 70% 에탄올로 소독하고, 1군 및 2군으로 분류된 쥐에는 구토제나 색소가 혼합되지 않은 50% 파라쿼트 다이클로라이드 용액(Zeneca agrochemicals, Fernfurst, UK)을 생리식염수에 50배 희석시켜 40 mg/kg(파라쿼트 이온으로 29.9 mg/kg)을 복강내 주사하였다. 2군의 쥐는 같은 방법으로 마취한 후 동량의 생리 식염수를 주사하였다. 2시간 후 다시 할로탄 마취를 유도하여 치료군에서는 cyclophosphamide 40 ㎎/kg를 복강내 주사하고 methylprednisolone 62.5 ㎎/kg을 우측 둔부에 근주하였으며 2군 및 기본군에서는 각 약물의 용매로 사용된 주사액을 같은 방법으로 주사하였다.

24시간 후 동일 방법으로 할로탄 마취를 유도하고 심장천자로 6 ml 이상의 채혈을 하였다. 개흉하여 심장절제로 실혈을 유도하여 쥐를 희생시킨 후 폐를 절제하여 10% 포르말린에 부유시켜 고정시켰다. 치료약물이 신장손상에 미치는 영향을 판정하기 위해 혈청 크레아티닌을 검사하였다. 절제폐는 7일간 고정시킨 후 Hematoxylin and eosin 및 Maison and trichrome 염색을 시행하여 해부병리 의사에게 염증세포의 침윤 정도, 부종의 정도, 출혈의 정도, 폐섬유화 정도를 매우 심함(5점), 심함(4점), 중간(3점), 경함(2점), 병변이 거의 없음(1점)의 5단계로 나누어 판독하도록 하였다.

또한 같은 조건에서 사육된 흰쥐를 치료군 10마리와 대조군 10마리로 각각 임의로 나누어 위와 동일용량으로 파라쿼트, 치료약물 및 치료약물 용매주사액을 투여하여 생존여부를 12시간 간격으로 관찰하여 치료군과 대조군사이의 생존기간의 차이를 생존분석을 통하여 약물의 효과를 분석하였다. 통계는 SPSS 8.0을 이용하여 윌콕슨 순위합 검정 및 생존분석을 시행하였다.

III. 결 과

치료군중 2마리에서 혈청 크레아티닌 농도가 4.3 mg/dl, 2.8 mg/dl 로 증가되었으며, 나머지 18마리에서는 정상이었는데 치료군과 비교군 사이의 통계학적 차이는 없었다(표 1). 폐의 병리소견에서 염증세포의 침윤 정도, 부종 정도, 출혈 정도, 폐섬유화 정도에서 치료군과 대조군 사이의 통계학적인 차이는 없었다(표 1). 파라쿼트를 투여한 경우는 투여하지 않은 경우보다 폐의 병리소견에 있어 부분적인 무기폐 소견 및 폐포격막의 비후 소견을 관찰할 수 있었다(그림 1, 2). 또한 파라쿼트를 투여한 치료군과 대조군에 있

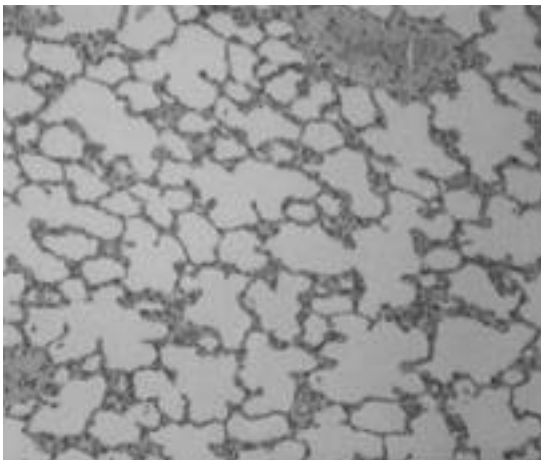

그림 1. 기본군: 흰쥐의 정상적 폐조직 소견 (배율×100, H-E 염색) 폐포격벽이 균일하고 정상적인 구조를 보인다.

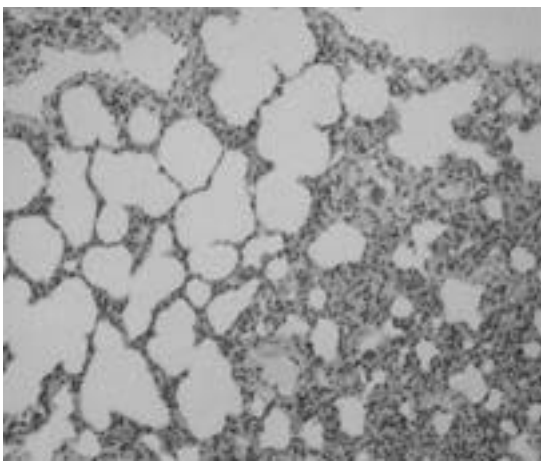

그림 2. 대조군: 파라쿼트만 투여한 흰쥐 폐의 병리소견 (배율×100, H-E 염색) 폐포격벽의 비후 및 부종, 부분적 무기폐 소견을 보인다.

표 1. 파라쿼트 중독 흰쥐에서 cyclophosphamide와 고용량 methylprednisolone 병용요법의 효과

	치료군	대조군	p 값*
혈청 크레아티닌(mg/dl)	1.17±1.40	0.58±0.38	>0.05
염증세포침윤정도**	2.89±0.60	3.33±0.70	>0.05
부종정도**	1.22±0.44	1.44±0.73	>0.05
출혈정도**	2.67±0.50	2.33±0.50	>0.05
섬유화정도**	2.88±0.93	2.56±0.53	>0.05

*: 윌콕슨 순위합 검정, **: 폐의 병리소견

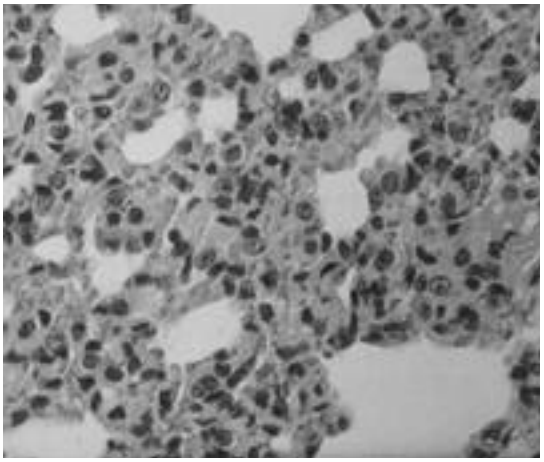

그림 3. 치료군: 파라쿼트 및 치료제를 투여한 흰쥐 폐의 병리 소견 (배율×400, H-E 염색) 염증세포 침윤, 부종, 폐포격벽의 비후, 무기폐 소견을 보인다.

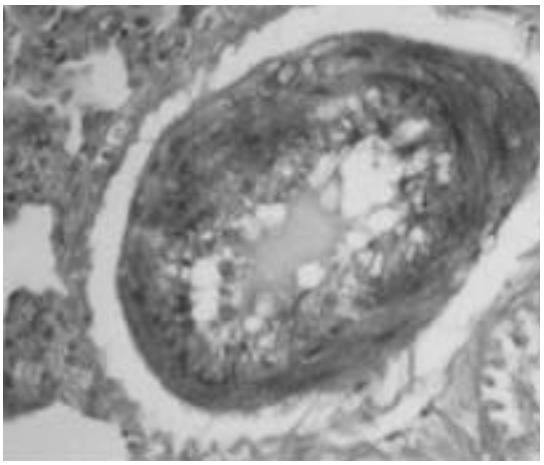

그림 4. 치료군: (배율×400, Masson's trichrome 염색) 기관지 주위 및 폐실질내 섬유질 들이 파란색으로 염색되었다.

어 염증세포침윤, 부종 및 출혈외 폐포격막의 비후, 폐섬유화 소견이 있었으나 치료군과 대조군사이의 뚜렷한 차이는 없었다(그림 3, 4). 생존율에 있어서도 각 군간에 통계학적인 차이는 없었다(그림 5).

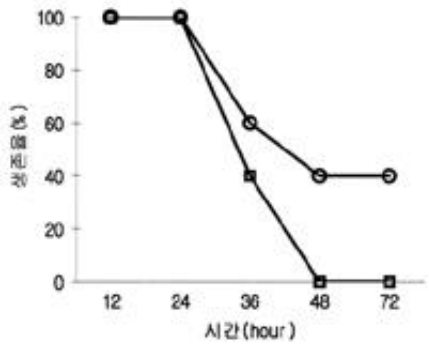

그림 5. Cyclpphosphamide와 고용량 methyl-prednisolone 병용요법이 파라쿼트 중독쥐의 생존율에 미치는 효과. 통계적 차이는 없으나 (P>0.05) 치료군에서 오히려 생존율이 낮은 경향을 보인다 (원: 대조군, 사각형: 치료군).

IV. 고 찰

파라쿼트(1,1'-dimethyl-4,4'-dipyridylium)는 1960년대부터 제초제로 알려진 후, 현재 100여개국에서 사용되어지고 있으며, 국내에서도 파라코 또는 그라목손이라는 상품명으로 판매되고 있다. 하지만, 사람에게 흡수될 경우 심각한 독작용을 일으키는 것으로 알려져 있으며 특히 음독하였을 경우 뚜렷한 치료방법이 없으며 치명적이다. 독성을 일으키는 기전이 확립되지는 않았지만 대체적으로 파라쿼트가 체내에 흡수될 경우 환원형 파라쿼트로 전환되며, 산소와 반응하여 superoxide기, peroxide기 등이 형성되어 세포막 등에 손상을 주는 것으로 알려져 왔다. 특히 산소농도가 높은 폐조직의 손상이 심하여 중독초기에 생존하더라도 시간이 흐름에 따라 폐섬유화증이 진행되어 호흡부전으로 사망하는 것으로 알려져 있다[12]. 중독환자 폐의 병리학적 소견은 초기에는 폐포상피세포가 벗겨지고 폐포내에는 fibronectin 등이 풍부해진다고 한다. 이후 섬유모세포 및 염증세포들이 상피세포사이로 이동하며 II형 세포가 재생되기 시작한다. 수일에서 수주간에 걸쳐 폐섬유화가 진행된다고 한다[9].

파라쿼트 중독을 치료하기 위해 수많은 치료법들이 시도되었다. Dimethyl sulfoxide 투여로 hydroxyl기를 제거함으로써 파라쿼트의 폐독성을 경감시켰다고 보고되었으며[24], Xantine oxidase inhibitor 인 allopurinol 투여로 파라쿼트 독성이 경감될 수 있을

것이라는 보고도 있었다[25]. Superoxide dismutase (SOD)가 치료제로서 추천되기도 하였는데[18] 그 효과는 확실치 않다[19]. 정 등은 cyclophosphamide 와 D-penicillamine 을 투여함으로써 토끼에서 생존률이 증가하였다고 보고하였다[26]. 파라쿼트 중독의 병리소견에서 염증세포 침윤이 관찰된 데 착안하여 고용량의 steroid 및 면역억제제의 사용이 제안되었는데[20] 고용량의 cyclophosphamide 와 dexamethasone 병용요법이 시도되어 75%생존율이 보고되기도 하였으나[21] 이후 이 치료법의 효과는 추가로 증명되지 못하였다[22].

최근 들어 경증 및 치명적인 환자를 제외한 중등도 및 중증의 파라쿼트 중독 환자를 대상으로 고용량의 cyclophosphamide와 methylprednisolone 병용요법을 시행하였을 때 대조군에 비해 생존율이 약 40% 증가함이 보고되었다[23]. 그러나 그 연구에서는 나이, 성별, 면역상태, 파라쿼트의 음독량 및 음독 후 치료 시작까지의 시간 등 서로 다른 조건 및 상태의 환자를 대상으로 하였으며 혈액투석 등 다른 여러 치료법들을 동시에 사용하였다. 저자들은 임상에서의 여러 다른 조건들을 동일하게 한 파라쿼트 중독 흰쥐 모델을 통하여 폐의 병리소견 및 생존기간을 분석하여 고용량 cyclophosphamide 및 methylprednisolone 병용요법의 효과를 검증하고자 하였다.

실험 결과 혈청 크레아티닌의 경우 치료군 중 2마리에서만 정상보다 상승된 소견을 보였으나 두 군간의 통계학적 차이는 없었다. 이는 예상과 반대되는 결과로서 치료제가 파라쿼트에 의한 신독성의 진행을 막지 못했거나 고용량의 치료제가 한꺼번에 투여되어 신기능 저하가 발생한 것으로 추정할 수 있다. 치료군과 대조군사이의 폐의 병리소견은 통계학적으로 차이가 없었으나 대조군에 비해 치료군에서 염증세포 침윤의 정도가 감소하는 경향을 보였는데 이는 치료약물의 항염증작용에 의한 것으로 생각된다. 생존율에 있어서도 통계학적 차이는 없었으나 치료군에서 오히려 감소하는 경향을 보였다.

결론적으로 cyclophospamide와 고용량 methylprednisolon병용요법은 흰쥐에서는 효과가 없었다. 이전에 Lin 등이 보고한 생존율의 증가는 다른 원인에 기여했을 가능성이 있다. 즉 cyclophosphamide 및 고용량 methylprednisolone 외에 흡착제, 혈액관류등 고전적인 파라쿼트 치료법을 병행하였는데 약물간 상호작용 등 알려지지 않은 기전에 의해 생존율의 향상이 나타났을 수도 있다. 또한 임상연구이므로 환자 선택에 있어 약물중독후 병원 내원까지의 시간, 파라쿼트 음독량등에 관한 병력청취가 불가능한 경우가 있었을 것이며 따라서 대상 환자의 선택에 있어 편견이 개입되었을 가능성과, 치료군에 대한 편견이 개입되었을 가능성도 배제할 수 없다. 하지만 파라쿼트 중독 사망률을 주장대로 18.2%로 줄일 수 있었다면 파라쿼트 및 치료제의 용량, 투여방법 등을 다양하게 조절하여 실험을 추가적으로 시행하는 것이 필요하다 하겠다.

V. 결 론

파라쿼트에 중독된 흰쥐에서 cyclophosphamide와 고용량의 methylprednisolone 병용요법의 효과를 분석하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. cyclophosphamide와 고용량 methylprednisolone 병용요법은 파라쿼트에 중독된 흰쥐의 폐장의 독성을 예방하지 못하였다.
2. cyclophosphamide와 고용량의 methylprednisolone 병용요법은 파라쿼트에 중독된 흰쥐의 생존율을 향상시키지 못하였다.

이상의 결과로 보아 cyclophosphamide와 고용량 methylprednisolone 병용요법을 파라쿼트의 중독 환자의 치료에 사용함에 있어 추가적인 동물 실험이 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Crome P: Paraquat poisoning. *Lancet* 8:333-334, 1986.
2. Yamashita M, Matsuo H, Ando Y: Analysis of

1,000 consecutive cases of acute poisoning in the suburb of Tokyo leading to hospitalization. *Vet Human Toxicol* 38:34-35, 1996.

3. **이한식**: **국내 파라쿼트 중독의 현황 및 대책**. *의협신문* **제**3319**호**: 16**면**, 1999.
4. Bus JS, Cagen SZ, Olgaard M, Gibson JE: A mechanism of paraquat toxicity in mice and rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 35:501-513, 1976.
5. Ellenhorn MJ: paraquat. 2nd Ed. Ellenhorn's Medical Toxicology: Diagnosis and treatment of human poisoning. *Williams & Wilkins*, p1631-1637, 1997.
6. Kimbrough RD, Gaines TB: Toxicity of paraquat to rats and its effect on rat lungs. *Toxicol Appl Pharmacol* 17:679-697, 1970.
7. Smith P, Heath D, Kay JM: The pathogenesis and structure of paraquat-induced pulmonary fibrosis in rats. *J pathol* 114:57-67, 1973.
8. Greenberg DB, Reiser KM, Last JA: Correlation of biochemical and morphologic manifestations of acute pulmonary fibrosis in rats administered paraquat. *Chest* 74:421-425, 1978.
9. Fukuda Y, Ferrans VJ, Schoenberger CI, Rennard SI, Crystal RG: Patterns of pulmonary structural remodeling after experimental paraquat toxicity. The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. *Am J pathol* 118:452-475, 1985.
10. Schoenberger CI, Rennard SI, Bitterman PB, Fukuda Y, Fermans VJ, Crystal RG: Paraquat-induced pulmonary fibrosis; role of the alveolitis in modulating the development of fibrosis. *Am Rev Respir Dis* 129:168-173, 1984.
11. Ecker JL, Hook JB, Gibson JE: Nephrotoxicity of paraquat in mice. *Toxicol Appl Pharmacol* 34:178-186, 1975.
12. Copland GM, Kolin A, Shulman HS: Fatal pulmonary intra-alveolar fibrosis after paraquat ingestion. *N Engl J Med* 291:290-292, 1974.
13. Fairshter RD, Wilson AF: Paraquat poisoning; Manifestations and therapy. *Am J Med* 59:751-753, 1975.
14. Idid SZ, Lee CY: Effects of Fuller's Earth and activated charcoal on oral absorption of paraquat in rabbits. *Clin Experi Pharmacol & Physiol* 23:679-681, 1996.
15. Solfrank G, Mathes C, Clarmann V: Hemoperfusion through activated charcoal in paraquat intoxication. *Acta Pharmacol Toxicol(Suppl)* 41:91-101, 1977.
16. Vale JA, Crome P, Volans GN, Widdop B, Goulding R: The treatment of paraquat poisoning using oral sorbents and charcoal hemoperfusion. *Acta Pharmacol Toxicol(suppl)* 41:109-117, 1977.
17. Rhodes ML, Zavala DC, Brown D: Hypoxic protection in paraquat poisoning. *Lab invest* 35: 496-500, 1976.
18. Wasserman B, Block ER: Prevention of acute paraquat toxicity in rats by superoxide dismutase. *Aviat Space Environ Med* 49:805-809, 1978.
19. Patterson CE, Rhodes ML: The effect of superoxide dismutase on paraquat mortality in mice and rats. *Toxicol appl pharmacol* 62:65-72, 1982.
20. Malcolmson E, Beesley J: Unsuccessful immuno-suppressant treatment of paraquat poisoning(letter). *Brit Med J* 650-651, 1975.
21. Addo E, Ramandial S, Poon-King T: High dosage cyclophosphamide and dexamethasone treatment of paraquat poisoning with 75% survival. *West Indian Med J* 33:220-226, 1984.
22. Perriens JH, Benimadho S, Kiauw LI, Wisse J, Chee H: High-dose cyclophospha mide and dexame-thasone in paraquat poisoning: a prospective study. *Hum Exp Toxicol* 11:129-134, 1992.
23. Lin JL, Leu ML, Liu YC, Chen GH: Sprospective clinical trial of pulse therapy with glucocorticoid and cyclophosphamide in moderate to severe paraquat-poisoned patients. *Am J Respir Crit care Med* 159:357-360, 1999.
24. **이종기**, **신현호**, **곽정식**, **손태중**: **다이메틸 설폭사이드가 급성 파라쿼트 중독시 폐에 미치는 영향**. *경북의대지* 36(1): 51-64, 1995.
25. **송명화**, **정미숙**, **오순식**, **박재윤**, **차종희**: **파라쿼트 독성에 미치는 다이쿠마롤과 알로퓨리놀의 병합 투여 효과**. *조선의대논문집* 20(1):1-12, 1995.
26. **정구영**, **최옥경**: **가토에서 파라쿼트 중독시 디-페니실아민과 싸이클로포스파마이드의 치료효과에 대한 실험적연구**. *대한응급의학회지* 7:458-471, 1996.